REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

Estratto dal vol. XXV, serie 5ª, 1° sem. fasc. 10°. — Seduta del 21 maggio 1916

Anatomia. — *Dimostrazione della natura condriosomica degli organuli cellulari colorabili col bleu pirrolo in cellule coltivate « in vitro »* (¹). Nota di GIUSEPPE LEVI, presentata dal Corrispondente GINO GALEOTTI.

A

409

Colorazioni vitali in cellule coltivate fuori dell'organismo furono fino ad oggi tentate da Hoffman (²) e da M. e W. Lewis (³). I due autori americani sottoposero le loro colture in mezzi liquidi inorganici all'azione del verde Janus, ma tale sostanza si dimostrò assai tossica per le colture anche in soluzioni diluitissime; cionondimeno, essi riescirono a mantenere in vita per qualche ora alcune cellule in cui i condriosomi si erano colorati elettivamente; fu notato che quegli organuli si disgregavano rapidamente.

Hoffmann adoperò il bleu-pirrolo iniettandolo (in cavie) per via endovenosa, poco prima di estrarre il plasma che doveva servire da terreno di coltura; in colture di fegato di embrioni di cavia (le quali, a giudicare dalle figure riprodotte, erano assai poco rigogliose) alcune cellule a forma stellata contenevano delle granulazioni colorate; altre, a forma affusata, ne erano del tutto prive. Le prime sono dall'A. interpretate come istiociti, le seconde come fibroblasti, Il metodo della colorazione vitale permetterebbe adunque di distinguere nelle colture quei due tipi di cellule.

L'A. si limita alla descrizione di preparati fissati in formolo, e non tratta affatto il problema della vera natura dei granuli colorati.

Le mie ricerche furono invece dirette a quest'ultimo particolare scopo.

Colture di miocardio, di tegumento, di corpo di Wolff di embrioni di pollo dall'8° al 12° giorno furono colorate col bleu-pirrolo aggiungendo al plasma ancora liquido, che doveva servire per la coltura, una certa quantità (maggiore o minore, a seconda dei casi) di una soluzione del colore in liquido di Ringer sterilizzata nell'autalave.

La presenza di una quantità abbondante di colore — il quale, quando il plasma coagula, precipita in grossolani ammassi — non danneggia la vitalità del pezzo esplantato; tanto le cellule mesenchimali quanto quelle dell'epidermide migrano nel plasma, e le prime vi si riproducono rigogliosamente. Frammenti di miocardio pulsarono per 3 giorni in plasma diluito in una solu-

(¹) Lavoro eseguito nell'Istitute di Anatomia umana della R. Università di Palermo.

(²) Hoffmann P., *Vitale Färbung embryonaler Zelden in Gewebskulturen.* Folia haematolog., Bd. 18, 1914.

(³) Lewis M. e Lewis W., *Mitochondria in Tissues-Cultures.* Americ. Journ. of Anat., vol. 16°, 1915.

zione 1/2 % di bleu-pirrolo nella proporzione di 3 : 1. Il plasma veniva disteso in uno strato sottilissimo: condizione, questa favorevole, per le ragioni esposte in altra mia pubblicazione ([1]), allo studio della struttura della cellula vivente. Per ottenere un maggior risalto delle parti colorate della cellula, il preparato, mantenuto nel termostato Pfeiffer alla temp. di 39-40°, veniva fortemente illuminato con luce artificiale e col condensatore.

La fissazione con formalina conserva, come è noto, la colorazione vitale; ma essa àltera tanto profondamente la forma degli organuli colorati e la costituzione del citoplasma, che essi diventano del tutto inutilizzabili per studî citologici; imagini migliori, ma sempre imperfette, si ottengono col bicromato-formolo. I liquidi contenenti tetrossido di osmio modificano la colorazione.

Del resto l'osservazione delle cellule viventi colorate *intra vitam* dà risultati tanto chiari, che lo studio dei preparati fissati diviene superfluo.

Rilevo anzi tutto che, negli organi da me studiati, quasi tutte le cellule mesenchimali e quelle del tegumento assumono il colore e che perciò in questo materiale non è possibile la distinzione in tipi cellulari, fondata sulle affinità tintoriali, che Hoffmann stabilisce.

In colture di 36 o 48 ore, numerosissime cellule mesenchimali emigrate nel plasma sono colorite in azzurro, e la colorazione si mantiene sino al 3° o 4° giorno. Esaminandole coll'obbiettivo ad immersione, si rileva che soltanto degli organuli a forma di granuli o di corti bastoncini, contenuti nel citoplasma, hanno assunto il colore con grande intensità; la parte fondamentale, meno refrangente del citoplasma ed il nucleo sono del tutto scolorati. I granuli sono più abbondanti in prossimità del nucleo; vanno diradandosi a poco a poco verso i prolungamenti.

Nelle cellule a forma affusata i granuli son più compatti; molto sparpagliati sono invece in quelle espanse in sottili lamelle.

Rivolgiamo la nostra attenzione su queste ultime, indubbiamente le più adatte per l'analisi citologica. Oltre ai granuli, si trovano verso la periferia della cellula, e soprattutto nei prolungamenti, dei filamenti relativamente lunghi, pure colorati in azzurro, ma meno intensamente dei granuli.

Esaminando per qualche tempo una determinata cellula, vediamo che i granuli colorati cambiano continuamente di sede, spingendosi nei prolungamenti e ritornando al punto di partenza; però ben di rado arrivano all'estremo distale dei prolungamenti. Tali spostamenti sono probabilmente in correlazione col movimento ameboide della cellula.

Anche i filamenti si spostano e cambiano di forma, diventando spesso più tozzi e più brevi; ed è interessante che tale trasformazione è accompa-

([1]) Levi G., *La costituzione del protoplasma studiata in cellule viventi coltivate fuori dell'organismo*. Arch. di fisiol. 1916.

gnata da un mutamento di colore; la lieve tinta azzurrognola che avevano diviene gradatamente più intensa, al punto che non si distinguono più dagli altri granuli.

Si tratta però di una trasformazione reversibile; ho veduto non pochi granuli allungarsi in filamenti ed assumere una tinta più sbiadita. In genere, quanto più tozzo è un filamento, tanto più intensa è la tinta che esso assume.

Se confrontiamo questi risultati con quelli ottenuti, in colture non colorate, da M. e W. Lewis e da me (loc. cit.), senza esitazione possiamo definire i granuli ed i filamenti colorati dal bleu-pirrolo come condriosomi; gli organuli, che nei preparati non colorati si distinguono per la maggiore rafrangenza dalla parte più tenue e più trasparente parte del citoplasma, corrispondono esattamente, per forma, sede e mobilità, alle formazioni colorite dal bleu-pirrolo. Con lo studio delle cellule viventi, vengono così ad essere confermati i risultati delle belle ricerche di Tschaschin [1]: che, cioè, per mezzo della tanto discussa colorazione vitale con le sostanze introdotte dal Goldmann nella tecnica (bleu-pirrolo, bleu-isamina, bleu-tripan) si ottiene una colorazione elettiva dei condriosomi. Secondo Tschaschin, nei fibroblasti colorati *intra vitam* col bleu-isamina il condrioma si presenta filamentoso, nelle cellule migranti in riposo granulare; in queste ultime si tingono inoltre delle grosse sfere, che dall'A. sono interpretate come prodotti secretorî. Dalle ricerche di Kijono [2] risulta che la colorazione vitale col carminio dà risultati analoghi.

La colorazione più intensa che acquistano i granuli di fronte ai filamenti negli elementi delle colture dipende probabilmente dalla maggiore densità che hanno le particelle di sostanza colorate nel primo caso. Anche nelle colture non colorate i mutamenti di forma dei condriosomi sono accompagnati da modificazioni nelle proprietà ottiche, modificazioni dipendenti probabilmente dal diverso grado di diluizione del colloide che li costituisce; nel divenir granulari, pèrdono acqua e diventano più refrangenti: e perciò nelle colture colorate *intra vitam* le particelle di colore — le quali, secondo la teoria fisica della colorazione sarebbero distribuite negli interstizî del tessuto — si addenserebbero gradatamente.

Ma un particolare importante non va dimenticato: nelle cellule colorate *intra vitam* i granuli prevalgono di fronte ai filamenti, mentre nelle colture non colorate si verifica l'opposto, ed anzi, finchè le cellule non mostrano segni di alterazione, i granuli possono mancare del tutto.

Io mi formai la convinzione, che tale modificazione di forma è un segno di una lieve alterazione dei condriosomi prodotta dalla presenza del colore

(1) Tschaschin, *Ueber vitale Färbung der Chondriosomen in Bindegewebszellen mit Pyrrholblau*. Folia haematologica, Bd. 14, an. 1912.

(2) Kijono, *Die vitale Karminepedcherung*. Jena, 1914.

nella coltura; per quanto il bleu-pirrolo sia dotato di tossicità tanto scarsa da non compromettere la vitalità nè la capacità riproduttiva delle cellule coltivate, nondimeno esso determinerebbe una lieve alterazione nella forma del condrioma, compatibile con la vita della cellula. Si tratta di quell'alterazione che venne messa in luce particolarmente da Ciaccio (¹) e che fu da lui definita *preplastoressi*.

S'accordano pienamente con tale supposizione i fatti sovra riferiti, riscontrati da M. e W. Lewis, che per effetto della colorazione con verde-Ianus i condriosomi si disgregano in granuli.

In cellule più profondamente alterate, quali si osservano specialmente al 3° o 4° giorno nelle colture colorate i condriosomi si alterano più profondamente: le forme a bastoncino ed a filamento scompaiono; i granuli si rigonfiano tanto da trasformarsi in cospicue vescicole colorate. Modificazioni codeste, che trovano il loro riscontro in quelle che si possono osservare facilmente in cellule alterate di colture non colorate.

Il condrioma colorito dal pirrolo fu studiato anche in elementi in mitosi; la sua forma ed il suo comportamento sono molto simili a quelli da me (loc. cit.) descritti nella mitosi di cellule non colorate. In qualche caso ho potuto vedere nella telofase molti granuli e bastoncini nel piano equatoriale, i quali si ripartivano in misura approssimativamente eguale nelle due cellule figlie; quando le due cellule figlie avevano un volume diverso, la repartizione avveniva in misura disuguale.

(¹) Ciaccio C., *Zur Physiopathologie der Zelle*: 1°, *Entartungsbilder der Plastosomen*. Zentraibl. f. allg. Path. u. path. Anat., Bd. 24, an. 1913.